

**BUNDE REPUBLIK DEUTSCHLAND**

Rec'd PCT/PTO 06 MAY 2005



REC'D 23 JAN 2004

WIPO

PCT

### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 53 351.2

**Anmeldetag:** 14. November 2002

**Anmelder/Inhaber:** Invitek Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH,  
Berlin/DE

**Bezeichnung:** Neuartige Pufferformulierungen zur Isolierung,  
Reinigung und Rückgewinnung lang- und kurz-  
kettiger Nukleinsäuren

**Priorität:** 08.11.2002 DE 102 52 545.5

**IPC:** C 07 H 21/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. Dezember 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

A 9161  
02/00  
EDV-L

BEST AVAILABLE COPY

## **Neuartige Pufferformulierungen zur Isolierung, Reinigung und Rückgewinnung lang- und kurzkettiger Nukleinsäuren**

**Anmelder:** Invitek Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH

**Erfinder:** Dr. Timo Hillebrand, Dr. Peter Bendzko

### **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft neuartige Formulierungen von Puffern zur Isolierung, Reinigung und Rückgewinnung von lang- und kurzkettigen Nukleinsäuren.

Die Anwendungsgebiete des Verfahrens sind alle mit Nukleinsäure-Isolierungen sich beschäftigenden Laboratorien, wie forensische Medizin, Lebensmitteldiagnostik, medizinische Diagnostik, Molekularbiologie, Biochemie, Gentechnik und alle anderen angrenzenden Gebiete.

Unter klassischen Bedingungen erfolgt die Isolierung von DNA aus Zellen und Geweben dadurch, dass die Ausgangsmaterialien unter stark denaturierenden und reduzierenden Bedingungen, teilweise auch unter Verwendung von proteinabbauenden Enzymen aufgeschlossen, die austretenden Nukleinsäurefraktionen über Phenol-/Chloroform-Extraktionsschritte gereinigt und die Nukleinsäuren mittels Dialyse oder Ethanolpräzipitation aus der wässrigen Phase gewonnen werden (Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., 1989, CSH, "Molecular Cloning").

Diese "klassischen Verfahren" zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Zellen und besonders aus Geweben sind sehr zeitaufwendig (teilweise länger als 48 h), erfordern einen erheblichen apparativen Aufwand und sind darüber hinaus auch nicht unter Feldbedingungen realisierbar. Außerdem sind solche Methoden auf Grund der verwendeten Chemikalien wie Phenol und Chloroform in einem nicht geringen Maße gesundheitsgefährdend.

Verschiedene alternative Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen biologischen Ausgangsmaterialien ermöglichen, die aufwendige und gesundheitsschädigende Phenol-/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren zu umgehen sowie eine Reduzierung der zeitlichen Aufwendungen zu erreichen.

Alle diese Verfahren basieren auf einer von Vogelstein und Gillespie (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 615-619) entwickelten und erstmals beschriebenen Methode zur präparativen und analytischen Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Die Methode kombiniert die Auflösung der die zu isolierende DNA- Bande enthaltende Agarose in einer gesättigten Lösung eines chaotropen Salzes (NaI) mit einer Bindung der DNA an Glaspartikel. Die an die Glaspartikel fixierte DNA wird anschließend mit einer Waschlösung (20 mM Tris HCl [pH 7,2]; 200mM NaCl; 2 mM EDTA; 50% v/v Ethanol) gewaschen und abschließend von den Trägerpartikeln abgelöst.

Diese Methode erfuhr bis heute eine Reihe von Modifikationen und wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt für unterschiedliche Verfahren der Extraktion und Reinigung von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Herkünften angewendet (Marko, M.A., Chipperfield, R. und Birnboim, H.G., 1982, Anal. Biochem., 121, 382-387).

Darüber hinaus existieren heute weltweit auch eine Vielzahl von Reagenziensystemen vor allem zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und für die Isolierung von Plasmid DNA aus bakteriellen Lysaten, aber auch für die Isolierung von längerkettigen Nukleinsäuren (genomische DNA, zelluläre Gesamt- RNS) aus Blut, Geweben oder auch Zellkulturen.

Alle diese kommerziell verfügbaren Kits basieren auf dem hinlänglich bekannten Prinzip der Bindung von Nukleinsäuren an mineralische Träger unter Anwesenheit von Lösungen unterschiedlicher chaotroper Salze und verwenden als Trägermaterialien Suspensionen feingemahlener Glaspulver (z.B. Glasmilk, BIO 101, La Jolla, CA), Diatomenerden (Fa.Sigma) oder auch Silicagеле. (Diagen, DE 41 39 664 A1).

Ein für eine Vielzahl unterschiedlicher Anwendungen praktikables Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren ist in US 5,234,809 (Boom) dargestellt. Dort ist ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus nukleinsäurehaltigen Ausgangsmaterialien durch die Inkubation des Ausgangsmaterials mit einem chaotropen Puffer und einer DNA-bindenden festen Phase beschrieben. Die chaotropen Puffer realisieren sowohl die Lyse des Ausgangsmaterials wie auch die Bindung der Nukleinsäuren an die feste Phase. Das Verfahren ist gut geeignet, um Nukleinsäuren aus kleinen Probenmengen zu isolieren und findet speziell im Bereich der Isolierung viraler Nukleinsäuren seine praktische Anwendung.

Entscheidende Nachteile des Verfahrens bestehen aber u.a. darin, dass der durch die chaotropen Puffer realisierte Aufschluss nicht für alle Materialien einsetzbar ist bzw. auch für größere Mengen an Ausgangsmaterialien nur extrem ineffizient und unter einem großen Zeitaufwand realisiert werden kann. Darüber hinaus sind mechanische Homogenisierungsverfahren notwendig, wenn z.B. DNA aus Gewebeproben isoliert werden soll. Weiterhin müssen für verschiedene Fragestellungen auch immer verschieden hohe Konzentrationen unterschiedlicher chaotroper Puffer eingesetzt werden. Das Verfahren ist damit in keiner Weise universell einsetzbar.

Das physiko-chemische Prinzip der nach dem bekannten Stand der Technik heute eingesetzten und kommerziell verfügbaren Systeme zur Isolierung von Nukleinsäuren auf der Basis der Bindung von Nukleinsäuren an die Oberflächen mineralischer Träger soll dabei in der Störung übergeordneter Strukturen des wässrigen Milieus bestehen, durch welche die Nukleinsäuren an der Oberfläche von mineralischen Materialien, insbesondere von Glas-bzw. Silicapartikeln adsorbieren. Die Störung der übergeordneten Strukturen des wässrigen Milieus erfolgt dabei immer unter Anwesenheit chaotroper Ionen und ist bei hohen Konzentrationen dieser fast quantitativ. Auf dieser beschriebenen physiko-chemischen Basis enthalten alle kommerziell verfügbaren Systeme zur Isolierung von Nukleinsäuren Pufferkompositionen mit hohen Ionenstärken chaotroper Salze, für die Bindung von Nukleinsäuren an eine Nukleinsäuren-bindende feste Phase.

Spezifische Modifikationen dieser Verfahren betreffen den Einsatz von spezifischen Trägermaterialien, welche für bestimmte Fragestellungen applikative Vorteile zeigen (Invitek GmbH WO 95/34569), die jedoch die gleichen Nachteile aufweisen.

All den beschriebenen Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren über die Bindung der Nukleinsäuren an mineralische feste Phase unter Verwendung chaotroper Salzlösungen ist gemeinsam, dass für die Bindung der Nukleinsäuren an die verwendeten Trägermaterialien hohe Konzentrationen eingesetzt werden müssen. Dabei sind gerade chaotrope Salze (z.B. Guanidinisothiocyanat, Guanidinhydrochlorid, Natriumperchlorat oder Natriumjodid) hochtoxisch wirksame Substanzen. Die Verwendung findenden Puffersysteme mit sehr hohen Ionenstärken bewirken oftmals ein Verschleppen von Salzkontaminationen in die zu isolierenden Nukleinsäuren und sind oftmals die Ursache dafür, dass eine Reihe von down-stream-Applikationen (PCR, Restriktionsverdau, Hybridisierungen, Ligationen) nicht oder nur teilweise realisierbar sind. Darüber hinaus besteht beim Umgang mit chaotropen Puffern ein erhebliches gesundheitliches

4

Risiko (insbesondere bei Langzeitanwendungen) sowie eine erhebliche Umweltbelastung durch in Abwasser eingebrachte Schadstofflasten.

In der Patentschrift DE 198 56 064 wird zum erstenmal ein neuartiges Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren beschrieben. Dabei erfolgt erstmals die Bindung der zu isolierenden Nukleinsäuren an mineralische Träger ohne die Verwendung der bisher dazu benötigten chaotropen Salze hoher Ionenstärken. Das Verfahren basiert (wie auch die chaotropen Verfahren) auf der Lyse des Ausgangsmaterials, der Bindung der Nukleinsäure an ein mineralisches Trägermaterial, dem nachfolgenden Waschen der gebundenen Nukleinsäuren mit ethanolhaltigen Waschpuffern, der Ethanolentfernung und der finalen Elution der Nukleinsäuren mit einem Elutionspuffer geringer Ionenstärke bzw. Wasser.

Für spezielle Protokolle z.B. der Isolierung von PCR-Fragmenten aus Amplifikationsansätzen wird der Lyseschritt nicht benötigt. Der PCR-Reaktionsansatz wird mit einem notwendigen Bindungspuffer versetzt und mit dem mineralischen Trägermaterial inkubiert. Anschließend erfolgt wieder ein Waschen mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer, nachfolgend die Ethanolentfernung und final die Elution der gebundenen Nukleinsäure vom Trägermaterial.

Das Verfahren ohne die Verwendung chaotroper Puffer deutliche Vorteile besitzen, zeigt sich daran, dass nach der Erstbeschreibung weitere Patentschriften auch die potenziellen Vorteile dieser neuen Bindungschemie beschreiben (z.B. DE 100 33 991).

Interessanterweise zeigt sich, dass alle weltweit kommerziell verfügbaren System zur Isolierung von Nukleinsäuren basierend auf der Bindung der Nukleinsäuren an mineralische Trägermaterialien (Magnetpartikel, Membranen, Carrier-Suspensionen u.a.) prinzipiell nach dem beschriebenen Verfahren arbeiten. Seit der Erstbeschreibung durch Vogelstein und Gillespie werden die gebundenen Nukleinsäuren immer mit Alkohol oder acetonhaltigen Salzlösungen gewaschen. Die Waschschrte sind essentieller Bestandteil der Extraktionsprotokolle und dienen neben der Entfernung von gebundenen unerwünschten inhibitorischen Stoffen immer auch der notwendigen Entfernung der für die Bindung der Nukleinsäuren notwendigen Salze.

Die Verwendung von Alkohol oder acetonhaltigem Waschpuffer bedeutet aber immer einen ganz erheblichen und bisher nicht gelösten Nachteil. Es ist bekannt, dass selbst Spuren von Alkohol in der finalen Nukleinsäure downstream-Applikationen ganz erheblich beeinträchtigen kann. Deshalb ist es immer notwendig, einen Ethanolentfernungsschritt im eigentlichen Verfahren zur Isolierung oder Aufreinigung von Nukleinsäuren zu integrieren.

Dieser ist immer problematisch bei der Verwendung magnetischer Partikel oder partikulärer Carrier-Suspensionen, beansprucht einen erheblichen zeitlichen Aufwand und kann zu einem irreversiblen Verlust der Nukleinsäure führen, vor allem bei der Übertrocknung der Carrier-Materialien.

Besonders problematisch ist der Schritt der Entfernung von Restalkohol bei Applikationen zur Isolierung von Nukleinsäuren im Hochdurchsatzbereich.

Im Allgemeinen werden bis zu 30 min benötigt, um Membranen in Filterplatten oder magnetische Partikel im Rahmen von automatisierten Nukleinsäure-Reinigungsverfahren vom Restalkohol zu befreien.

Darüber hinaus sind auch die eigentlichen Waschschriffe mit alkoholischen Waschpuffern gerade im Hochdurchsatzbereich zeitaufwendig und natürlich auch kostenintensiv.

Aus diesen Nachteilen des bisherigen Standes leitet sich die Aufgabe ab, den Einsatz alkoholischer Komponenten zu vermeiden und damit eine erhebliche Verkürzung der Isolierungs- und Reinigungsverfahren zu erreichen.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert

Basierend auf der Verwendung nichtchaotroper Pufferformulierungen, wie in der Patentschrift DE 198 56 064 schon aufgeführt, zeigt sich, dass für die Bindung zu isolierender Nukleinsäuren nur unerwartet geringe Konzentrationen notwendig sind.

Der Kernpunkt der Erfindung liegt im gleichzeitigen Einsatz von mono- und von multi-, bevorzugt divalenten Kationen für die Bindung der Nukleinsäuren an die feste Phase.

Als monovalente Kationen werden bevorzugt  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{NH}_4^+$  in Form der entsprechenden Salze eingesetzt. Als divalente Kationen werden bevorzugt  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  in Form der entsprechenden Salze eingesetzt. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform ist der kombinierte Einsatz von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$ .

Die mono- und multi-, bevorzugt divalenten Kationen können gemäß der Erfindung in den unterschiedlichsten Mengenverhältnissen eingesetzt werden. Der Erfolg tritt im breiten Bereich von mono-:divalenten Kationen im molaren Verhältnis von 9:1 bis 1:9 ein. Bevorzugt sind

Kombinationen von 7:3 bis 3:7 und 6:4 bis 4:6, besonders bevorzugt ist die Ausführungsform mit gleichen (1:1) bzw. nahezu gleichen molaren Mengen von mono- und divalenten Kationen.

Die Gesamt-Kationenkonzentration in der Lösung vor der Bindung an die feste Phase ist bevorzugt  $< 0,5 \text{ M}$ .

Wenn die Nukleinsäuren in einer Lösung vorliegen, die bereits mono- oder divalente Kationen enthält, z. B. nach einer vorangegangenen Lyse unterschiedlichster Ausgangsmaterialien, dann wird die vorhandene Menge der Kationen bei der Einstellung der gemäß der Erfindung optimalen Kationenkonzentration berücksichtigt. Wenn also der Lysepuffer divalente Kationen enthält, die nach der Lyse in der Lösung enthalten sind, wird nur noch die benötigte Menge monovalenter Kationen zugesetzt (und umgekehrt).

Ein besonders wichtiges Merkmal der Erfindung ist auch, dass die gemäß der Erfindung verwendeten Waschpuffer keine alkoholische Komponente enthalten, wie bei allen anderen Verfahren des Standes der Technik.

Überraschend ist dabei, dass bei der Kombination von Salzen eines monovalenten mit einem multivalenten Kation die für eine Bindung notwendigen Konzentrationen in einem Bereich liegen, in den Pufferformulierungen bestehend nur aus jeweils einem Salz nicht mehr für die Bindung ausreichend sind. So ermöglicht die Kombination von Magnesiumchlorid und Natriumchlorid noch bei Mengen von weniger als jeweils 5 mM jeweils die Bindung von Nukleinsäuren eines weiteren Größenspektrums (Beispiel 1). Die Verwendung der Mischung von Salzen monovalenter mit multivalenten Kationen als Bestandteile von Bindungspuffern für die Bindung von Nukleinsäuren an mineralische Träger ist bisher noch nicht beschrieben. Das überraschende Ergebnis ermöglicht nunmehr eine völlig neue Strategie zur Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsproben. Da überraschenderweise nur noch extrem geringe Salzkonzentrationen in Bindungspuffern notwendig sind, wird es möglich, Nukleinsäuren aus komplexen Proben oder aus Lösungen, welche eine Vielzahl an zu entfernenden Stoffen enthalten, mit neuartigen Waschpuffern ohne das bisher notwendige Ethanol bzw. auch gänzlich ohne einen Waschschrift zu isolieren.

Dies hat enorme Vorteile für die Isolierung von Nukleinsäuren und löst die geschilderten Probleme der Verwendung von alkoholhaltigen Waschpuffern insbesondere bei automatisierten Hochdurchsatzanwendungen in idealster Weise. So ermöglicht die Verwendung der erfindungsgemäßen Pufferformulierungen z.B. die Aufreinigung von PCR-Produkten aus einem

komplexen PCR-Reaktionsansatz für eine nachfolgende empfindliche Sequenzierungsreaktion und ohne einen einzigen Waschschriff in Form einer automatisierten Applikation (Bindung der PCR-Produkte an die Filtermembran einer 96-Well-Platte) in weniger als 10 min. Bisherige Verfahren auf der Basis der Bindung der Nukleinsäure an eine feste Phase benötigen ca. 45 min – 1h. Darüber hinaus ist der Verfahrensablauf nunmehr extrem einfach und beinhaltet lediglich das Mischen des PCR-Ansatzes mit einem der erfindungsgemäßen Bindungspuffer, das Überführen des Ansatzes auf die Filterplatte, das Durchsaugen der Lösung und die nachfolgend Elution der PCR-Produkte mittels Wasser bzw. mittels einer 10 mM Tris gepufferten wässrigen Lösung. Damit können PCR-Produkte extrem zeitsparend, ungefährlich und preiswert aufgereinigt werden. Der Durchsatz kann dabei dramatisch erhöht werden (auch bei sinkendem apparativen Aufwand; z.B. wird kein Wasch-Tool mehr bei einem Roboter benötigt). Die Qualität der aufgereinigten PCR-Produkte ist sehr hoch, was sich an den sauberen Sequenzreaktionen zeigt (Beispiel 2).

Weiterhin zeigt sich überraschender Weise, dass man Nukleinsäuren auch aus komplexen biologischen Proben in exzellenter Qualität und Quantität auch ohne Waschschriffe oder mittels eines Waschpuffers ohne Alkohol isolieren kann. Die in der Offenlegungsschrift DE 100 33 991 in einem Beispiel beschriebene Isolierung einer Plasmid DNA ohne einen Waschschriff erfolgte nicht aus dem zuvor hergestellten, geklärten Lysat. Die zu isolierende Plasmid-DNA wurde mittels bekannter Standardverfahren erst in reiner Form hergestellt und diese Plasmid-DNA nochmals mit einem Puffer inkubiert, an eine feste Phase gebunden und nachfolgend nach der notwendigen Entfernung des Alkohols des Bindungspuffers wieder von der festen Phase abgelöst.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es nunmehr möglich, Plasmid-DNA direkt aus dem geklärten Lysat aufzureinigen wobei wiederum kein Waschen mit einem alkohohaltigen Waschpuffer notwendig ist bzw. die Isolierung der Plasmid DNA auch ohne Waschschriff direkt nach der erfolgten Bindung an eine feste Phase erfolgen kann. Die Plasmid DNA ist dabei wiederum von exzellenter Qualität und Quantität (Ausführungsbeispiel 3).

Die Erfindung gestattet es weiterhin, auch extrem schnell, preiswert und einfach genomische Nukleinsäuren aus komplexen biologischen Proben zu isolieren. So wird lediglich ein Standardaufschluß des Ausgangsmaterials mittels z.B. eines klassischen Protease K-Verdaus in einem dafür kompatiblen Puffer durchgeführt, anschließend die lysierte Probe mit einem der erfindungsgemäßen nichtchaotropen Bindungspuffer versetzt und der Ansatz mit einer Nukleinsäure bindenden festen Phase inkubiert, ggf. mit einem nichtalkoholischen Waschpuffer



gewaschen (oder ggf. ohne einen Waschschrift) und nachfolgend die genomische Nukleinsäure mittels Wasser oder einer Tris-Lösung von der festen Phase isoliert. Die Qualität der isolierten DNA ist wiederum sehr hoch, sie ist sofort für weitere Applikationen einsetzbar.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht somit in universeller Form eine deutliche Vereinfachung von Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Komplexen die nukleinsäureenthaltenden Proben. Das Verfahren benötigt keine toxischen Chemikalien mehr, die eingesetzten Mengen an Salzen sind dramatisch reduziert, was zu einer deutlichen Umweltentlastung führt, die Verfahren benötigen weniger Verfahrensschritte und sind dadurch deutlich schneller als alle bisher verwendeten Techniken. Insbesondere im Hochdurchsatz stehen nunmehr preiswerte und extrem schnelle Verfahren zur Verfügung.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen erklärt. Die Ausführungsbeispiele sollen aber keine Limitierung der Erfindung darstellen.

## Ausführungsbeispiele

### Beispiel 1:

Aufreinigung eines Spektrums an DNA-Fragmenten aus einer wässrigen Lösung . Vergleich verschiedener Bindungspuffer hinsichtlich der Bindungseffizienz.

Puffer TH 1 (5 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>/Tris HCl, Isopropanol)

Puffer TH 2 (10 mM MgCl<sub>2</sub>/Tris HCl, Isopropanol)

Puffer TH 3 (10 mM NaCl/Tris HCl, Isopropanol)

Der Puffer TH1 ist eine Kombination aus einem monovalenten und einem divalenten Salz bei einer Gesamtionenstärke von 10 mM. Die Puffer TH2 und TH3 enthalten nur jeweils ein Salz (mit einem monovalenten Kation bzw. mit einem divalenten Kation) bei einer Gesamtionenstärke von 10 mM. 130 µl der jeweiligen Puffer wurden mit einer kommerziellen DNA-Leiter (Fa. FERMENTAS) enthaltene wässrige Lösung von 50 µl gemischt und der Ansatz auf eine Zentrifugationssäule mit einem Glasfaserfließ überführt. Anschließend wurde 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert und die Zentrifugationssäule in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der gebundenen Fragmente erfolgt durch die Zugabe von 30 µl einer 10 mM Tris-HCl-Lösung und nachfolgender Zentrifugation für 1 min. Die Gesamtzeit der Isolierung der DNA-Fragmente betrug damit nur ca. 2 min. Die erhaltenen Eluate wurden auf ein 1,2 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Wie in der elektrophoretischen Darstellung deutlich zu sehen ist, erfolgt eine effiziente Rückgewinnung der DNA-Fragmente nur mit dem Kombinationspuffer. Die jeweils nur ein Salz enthaltenden Bindungspuffer dagegen zeigen nur noch eine sehr geringe Bindungsvermittlung. (Abbildung 1)

**Beispiel 2:**

Aufreinigung von PCR-Produkten aus einem komplexen PCR-Reaktionsansatz und nachfolgende Verwendung der aufgereinigten PCR-Produkte für eine DNA-Sequenzierung.

50 µl PCR-Reaktionsansätze wurden mit 130 µl Bindungspuffer TH1 und TH4 (50 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub> /Tris HCl, Isopropanol) versetzt, nachfolgend auf eine Zentrifugationssäule mit Glasfaserfließ überführt, für 1 Minute zentrifugiert und abschließend die DNA wieder mittels 10 mM Tris HCl von der Säule eluiert. Die isolierten PCR-Produkte wurden dann für die Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzierungsergebnisse belegen, dass ohne die Verwendung von bisher notwendigen Waschschritten alle störenden Komponenten effizient entfernt wurden und eine hochreine DNA vorliegt.

(Abbildungen 2-5)

**Beispiel 3:**

Isolierung von Plasmid DNA aus bakteriellen Lysaten. Vergleich der Reinheit der isolierten Plasmid DNA bei unterschiedlichen Waschbedingungen bzw. ohne einen Waschschrift.

2 ml einer bakteriellen Übernachtskultur (XL-1 mit Plasmid pGEM) wurden zentrifugiert und das Pellet mit 200 µl Solution I (Tris, EDTA, Rnase A) resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Solution II (SDS/NaOH). Die Reaktionsgefäße wurden mehrmals kurz vorsichtig geschüttelt. Nachfolgend erfolgte die Zugabe 200 µl einer Solution III (250 mM MgCl<sub>2</sub>/Tris HCl). Die Reaktionsgefäße wurden kurz und vorsichtig geschüttelt und für 5 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde mit 100 µl Isopropanol gemischt und auf eine Zentrifugationssäule mit einem Glasfaserfließ gegeben und für 1 min zentrifugiert. Nachfolgend wurden jeweils 3 Proben sofort mit 10 mM Tris versetzt (kein waschen), 3 Proben wurden mit 800 µl eines Waschpuffers ohne Alkohol (10mM NaCl/10mM MgCl<sub>2</sub>/Tris HCl) versetzt und für 1 min zentrifugiert und nachfolgend die Plasmid-DNA mit 10 mM Tris-HCl von der Säule eluiert und 3 Proben wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen, nachfolgend der Ethanol entfernt und die Plasmid DNA wiederum durch Zugabe von 10 mM Tris HCl eluiert.

Die nachfolgende Tabelle illustriert die notwendige Präparationszeit, die Qualität und Quantität der isolierte Plasmid DNA.

Probe	Waschschrift	Ratio 260:280	Ausbeute	Präparationszeit
1	Kein Waschen	1,71	12 µg	8 min
2	Kein Waschen	1,74	15 µg	8 min
3	Kein Waschen	1,81	14 µg	8 min
4	Waschen ohne Alkohol	1,82	15 µg	10 min
5	Waschen ohne Alkohol	1,81	14 µg	10 min
6	Waschen ohne Alkohol	1,84	12 µg	10 min
7	Waschen mit Alkohol	1,86	14 µg	16 min
8	Waschen mit Alkohol	1,92	16 µg	16 min
9	Waschen mit Alkohol	1,89	13 µg	16 min

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Lösung durch Bindung an eine feste Phase, dadurch gekennzeichnet, dass man die Nukleinsäure enthaltende Lösung mit Zusätzen so einstellt, dass sie monovalente und multivalente Kationen sowie einen Alkohol und ggf. weitere Zusätze enthält, sie danach mit der festen Phase in Kontakt bringt, den Träger anschließend ggf. wäscht und die Nukleinsäure von der festen Phase löst.

2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass als monovalente Salzkomponeute Ammoniumchlorid, Natriumchlorid und/oder Kaliumchlorid verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass als multivalente Salzkomponeute Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Zinkchlorid und/oder Manganchlorid, verwendet wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass als monovalente Salzkomponeute Natriumchlorid und als multivalente Salzkomponeute Magnesiumchlorid verwendet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die monovalente und die multivalente Salzkomponeute im molaren Mengenverhältnis 9:1 bis 1:9 verwendet werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die monovalente und die multivalente Salzkomponeute im molaren Mengenverhältnis 7:3 bis 3:7 verwendet werden.

7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die monovalente und die multivalente Salzkomponeute im molaren Mengenverhältnis 6:4 bis 4:6 verwendet werden.

8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die monovalente und die multivalente Salzkompente im molaren Mengenverhältnis 1:1 bis nahezu 1:1 verwendet werden.

9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Salzkompenten Natriumchlorid und Magnesiumchlorid im molaren Verhältnis 1:1 verwendet werden.

10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Endkonzentration der Salzkompenten in der Lösung > 5mMol beträgt.

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Alkohol Ethanol oder Isopropanol verwendet wird.

12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als weitere Zusätze Tris-HCl oder Polyvinylpyrrolidon verwendet werden.

13. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als feste Phase alle Trägermaterialien eingesetzt werden, die bei der Isolierung mit chaotropen Reagenzien Anwendung finden.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Trägermaterialien Glasfaservliese, Silicamembranen, oder Membranen, die funktionelle Gruppen tragen, die Glasfaservliese oder Silicamembranen entsprechen, eingesetzt werden.

15. Verfahren nach Anspruch 13 und 14, dadurch gekennzeichnet, dass als feste Phasen Suspensionen aus  $\text{SiO}_2$ , Aerosilen oder magnetisierten Silikapartikeln eingesetzt werden.

16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Waschpuffer Lösungen von monovalenten und multivalenten Salzkompenten mit geringerer Ionenstärke, als für die vorhergehende Bindung notwendig war, ohne alkoholische Komponente eingesetzt werden.

17. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, dass als Elutionspuffer Wasser oder Wasser mit Tris-HCl-Zusatz verwendet wird.

18. Testkit zur Isolierung von DNA aus beliebigen Ausgangsmaterialien enthaltend

- eine wässrige Lösung, die monovalente und multivalente, bevorzugt divalente, Kationen enthält,
- eine feste Phase, bevorzugt als fester Bestandteil von Zentrifugenröhrchen, 96 Well- oder 384 Well Filtrationsplatten,
- Wasch- und Elutionspuffer ohne Alkoholzusatz.

19. Testkit nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass

die feste Phase Glasfaservliese, Glasmembranen, Siliciumträger oder Aerosile sind.

20. Testkit nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass

als feste Phase lose Schüttungen, bevorzugt  $\text{SiO}_2$ , gefällte Kieselsäure, pyrogene Kieselsäure oder magnetische Silicapartikel eingesetzt werden

## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neuartige Formulierungen von Puffern zur Isolierung, Reinigung und Rückgewinnung von lang- und kurzkettigen Nukleinsäuren.

Die Anwendungsgebiete des Verfahrens sind alle mit Nukleinsäure-Isolierungen sich beschäftigenden Laboratorien, wie forensische Medizin, Lebensmitteldiagnostik, medizinische Diagnostik, Molekularbiologie, Biochemie, Gentechnik und alle anderen angrenzenden Gebiete.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man die Nukleinsäure enthaltende Lösung mit Zusätzen so einstellt, dass sie monovalente und multivalente Kationen sowie einen Alkohol und ggf. weitere Zusätze enthält, sie danach mit der festen Phase in Kontakt bringt, den Träger anschließend ggf. wäscht und die Nukleinsäure von der festen Phase löst.

Als monovalente Salzkomponeute wird Ammoniumchlorid, Natriumchlorid und/oder Kaliumchlorid verwendet. Als multivalente Salzkomponeute wird Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Zinkchlorid und/oder Manganchlorid, verwendet.

Eine besonders bevorzugte Variante ist der Einsatz gleicher molarer Mengen von Natriumchlorid und Magnesiumchlorid.



**Abbildung 1:**

Aufreinigung eines Spektrums an DNA-Fragmenten aus einer wässrigen Lösung . Vergleich verschiedener Bindungspuffer hinsichtlich der Bindungseffizienz.

Spuren 1 und 2 : Isolierte DNA Leiter unter Verwendung des Puffers TH3  
(monovalentes Kation im verwendeten Salz)

Spuren 3 und 4 : Isolierte DNA Leiter unter Verwendung des Puffers TH2  
(divalentes Kation im verwendeten Salz)

Spuren 5 und 6 : Isolierte DNA Leiter unter Verwendung des Puffers TH1  
(Kombination der beiden Salze; monovalentes und divalentes Kation)

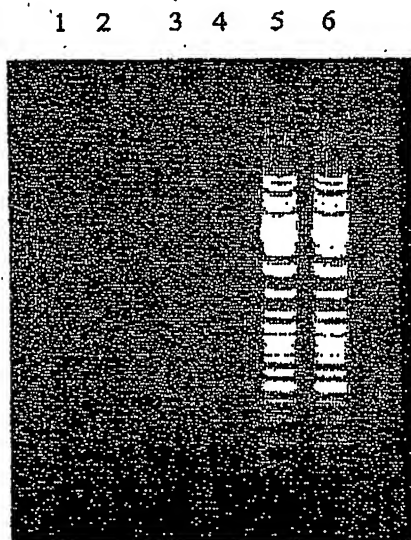


Abb. 2

**ABI PRISM**  
Model 377  
Version 3.4  
LR-377  
Version 3.3.1b2

5-2.2-1v.f  
5-2.2-1v.f  
Lane 73

*Refer TH1*

Signal G347 A:304 T:272 C:211  
DT (BD Set Any-Primer)  
MATRIX E  
Points 2038 to 5100 Pk1 Loc: 2038

Page 1 of 1  
Fri, 8, Nov 2002 7:08  
Don, 7, Nov 2002 14:23  
Spacing: 14.24[14.24]

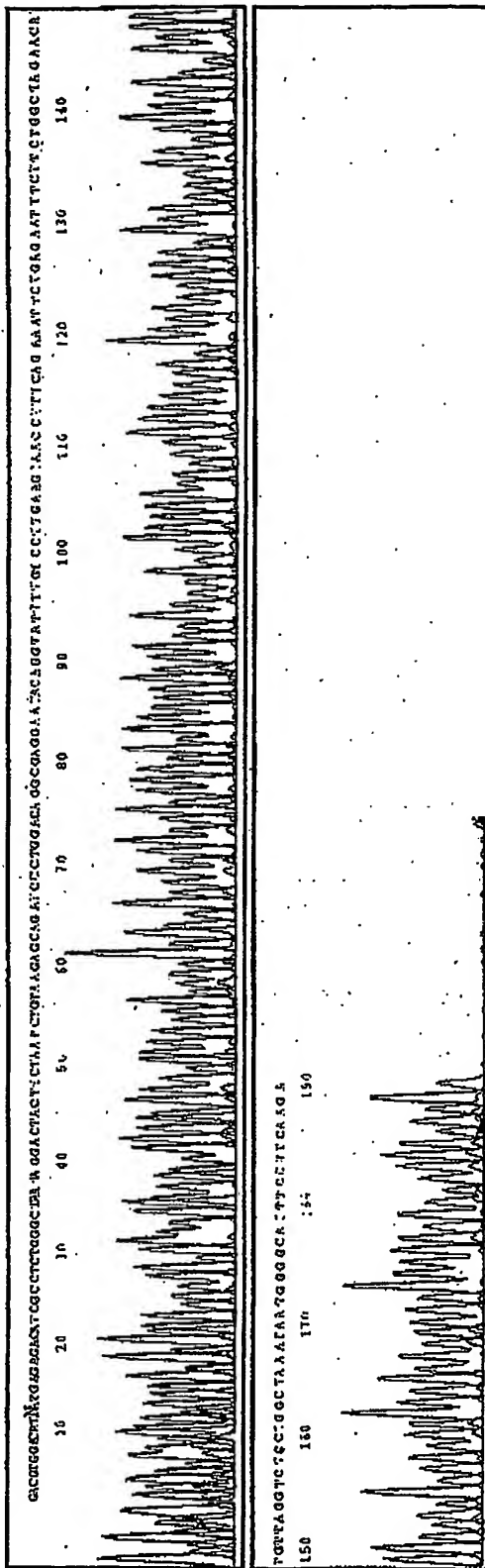




Abb. 4

Model 377  
Version 3.4  
LR377  
Version 3.3.1b2

5-2,3-fvlf  
5-2,3-fvlf  
Lane 77

Signal G:379 A:303 T:274 C:219  
DT (BD Set Any-Primer)  
MATRIxE  
Points 2027 to 5100 Pk 1 Loc: 2027

Page 1 of 1  
Fri, 8. Nov 2002 7:13  
Don, 7. Nov 2002 14:23  
Spacing: 14.27(14.27)

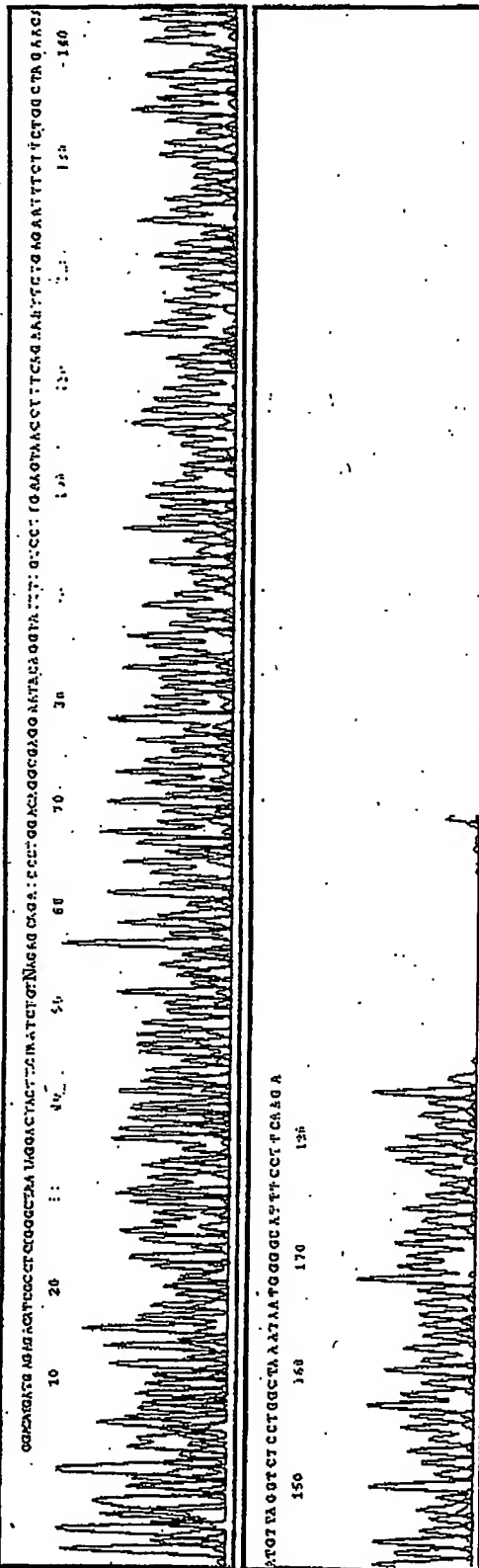




Abb. 5



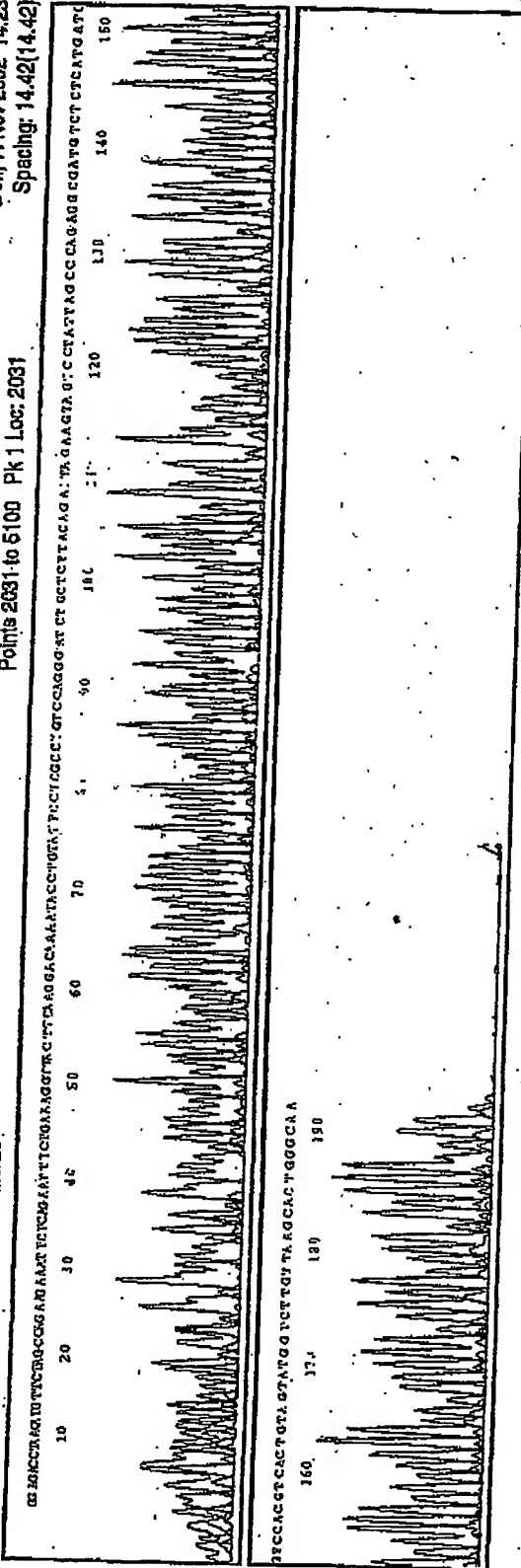
Model 377  
Version 3.4  
LF-377  
Version 3.3.1b2

5-2,3-4V,r  
5-2,3-4V,r  
Lane 28

*Full TH4*

Signal G:336 A:288 T:250 C:215  
DT (BD Sat Any-Primer)  
MATRIX E  
Points 2031 to 5100 Pk 1 Loc: 2031

Page 1 of 1  
Fri, 8 Nov 2002 8:45  
Don, 7 Nov 2002 14:23  
Sequencing: 14.42(14.42)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**